

Взаимосвязь цинк-зависимых биомаркеров нестабильности атеросклеротической бляшки (ММП-9, ТИМП-1) и цинка у пациентов с каротидным атеросклерозом
Розыходжаева Г. А.¹, Усманова З. А.²

¹Розыходжаева Гульнора Ахмедовна / Rozikhodjaeva Gulnora Akhmedovna – доктор медицинских наук, доцент, кафедра ультразвуковой диагностики;

²Усманова Захро Абдувалиевна / Usmanova Zakhro Abdvaliyevna – старший научный сотрудник-соискатель,

кафедра клинической лабораторной диагностики,
Ташкентский институт усовершенствования врачей, г. Ташкент

Аннотация: определены уровни матричной металлопротеиназы-9 (ММП-9) и ее тканевого ингибитора (ТИМП-1) в сыворотке, также концентрация Zn в сыворотке, волосах и биоптатах атеросклеротических бляшек (АСБ) сонной артерии у пациентов с нестабильными АСБ. Полученные результаты уточняют взаимосвязь цинк-зависимых эндопептидаз, как биомаркеров нестабильности АСБ (ММП-9, ТИМП-1) и цинка у пациентов с каротидным атеросклерозом и могут помочь в отборе больных с высоким риском развития сердечно-сосудистых событий.

Abstract: the levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor (TIMP-1) in serum and the concentration of Zn in the serum, hair, biopsies and atherosclerotic plaques (CRS) of the carotid artery in patients with unstable CRSs. The results obtained clarify the relationship of zinc-dependent endopeptidases as biomarkers instability ASB (MMP-9, TIMP-1) and zinc in patients with carotid atherosclerosis and can help in the selection of patients at high risk for cardiovascular events.

Ключевые слова: матриксная металлопротеиназа-9, тканевой ингибитор металлопротеиназы-1, цинк, нестабильная атеросклеротическая бляшка.

Keywords: matriksny metalproteinase-9, fabric metalproteinase-1 inhibitor, zinc, unstable atherosclerotic plaque.

Нестабильность атеросклеротической бляшки (АСБ) является главной причиной инфаркта миокарда (ИМ) и инсульта [14, с. 253]. Вместе с тем, склонные к разрыву АСБ сонной артерии являются независимыми факторами риска, наличия коронарного атеросклероза и развитие ИМ [1, с. 21]. Уязвимость АСБ зависит от многих факторов таких, как дисфункция эндотелия, воспалительные клетки, продукция цитокинов, содержание гладкомышечной клетки и гибель клеток (апоптоз) [11, с. 70].

Ранимые АСБ имеют тонкую, воспаленную и бедную коллагеновым волокном фиброзную покрышку, которая содержит повышенные уровни матриксных металлопротеиназ (ММП) [14, с.255]. Существует дисбаланс между ММП и тканевыми ингибиторами (ТИМП) в нестабильных АСБ сонных артерий, что определяет уровни этих маркеров в плазме крови [16, с. 355].

Известно, что ММП относятся к семейству цинк-зависимых эндопептидаз, ответственного за расщепление и восстановление внеклеточного матрикса соединительной ткани. Установлена связь уровня ММП-9 в сыворотке с нестабильностью каротидного атеросклероза [9, с. 200; 13, с. 18; 17, с. 51; 21, с. 670]. ММП в своем каталитическом домене содержит ионы цинка (Zn²⁺) [22, с. 3752].

Цинк (Zn), в свою очередь, играет важную роль в биологических системах с разнообразной функцией, связанной с цинк-связывающими белками. Более 10% человеческого протеомного пула потенциально способно связывать цинк в естественных условиях (in vivo). ММП активируется с помощью транспортировки ионов Zn²⁺ от металлоионеина на ММП [22, с. 3764]. Установлена также взаимосвязь дефицита уровня цинка в различных биосубстратах с развитием ожирения, сахарного диабета 2 типа, гипертонической болезни, ишемической болезни сердца (ИБС) и атеросклероза [3, с. 167]. Концентрация Zn одновременно в волосах, АСБ сонной артерии и сыворотке у больных с нестабильными каротидными АСБ, также их связь с сывороточным уровнем ММП-9 и ТИМП-1 до настоящего времени не изучалась.

Цель исследования

Изучить уровни цинка в сыворотке крови, волосах, биоптатах атеросклеротических бляшек сонной артерии и их связь с уровнем ММП-9, ТИМП-1 в сыворотке у больных со стабильными и нестабильными атеросклеротическими бляшками сонных артерий.

Материал и методы

В исследование включено 73 пациентов (55 мужчин и 18 женщин) в возрасте от 46 до 88 лет (средний возраст 65,96±1,07 лет) с атеросклеротическими бляшками сонных артерий. В контрольную группу вошли 10 здоровых лиц сопоставимого возраста и пола. Больные разделены на две группы, в зависимости от стабильности АСБ по данным предварительного дуплексного сканирования. Первую группу составили 45 пациентов со стабильными АСБ, и во вторую группу включено 28 больных с нестабильными АСБ. Критериями исключения из исследования были острый инфаркт миокарда, кардиомиопатии, острый миокардит, перикардит, острое нарушение мозгового кровообращения, злокачественные опухоли, диффузные

заболевания соединительной ткани, острые инфекционные заболевания, пневмофиброз и тяжелая хроническая обструктивная болезнь легких, больные с фракцией выброса левого желудочка менее 45%.

Всем пациентам проведено цветное дуплексное сканирование внечерепных отделов брахиоцефальных артерий на ультразвуковом сканере HD3 (Phillips, Нидерланды) по стандартной методике при помощи линейного датчика частотой 5,0-10,0 МГц. Расчет степени стенозирования (СССА) осуществлялся в зоне максимального сужения просвета артерии. Исследованы общие и внутренние сонные артерии, каротидные бифуркации на наличие АСБ. Определялась толщина комплекса интима-медиа общей сонной артерии (ТКИМ ОСА) как в стандартной точке измерения (за 1 см до каротидной бифуркации), так и в области атеросклеротической бляшки (максимальная ТКИМ). ТКИМ ОСА $\geq 1,4$ мм оценивалась как АСБ, а в пределах 1,0-1,3 мм как утолщение ТКИМ. Изучены скорость кровотока, характер, тип, эмбологенность, поверхность, длина и расположение АСБ. Все обнаруженные АСБ были оценены на стабильные (кальцинированные, гомогенные и гетерогенные) и нестабильные (с шероховатой поверхностью, с изъязвлением и/или кровоизлиянием).

Все пациенты осмотрены невропатологом, кардиологом, сосудистым хирургом. Больные второй группы (с гемодинамически значимыми нестабильными АСБ сонных артерий) направлены в клинику Ташкентской медицинской академии, где им (после письменного информированного согласия) выполнена каротидная эндартерэктомия (КЭЭ). Все операции проводились с использованием стандартных хирургических методов. Образцы АСБ были получены сразу после КЭЭ и доставлены в лабораторию для определения цинка. У этих отобранных больных за 1 день до операции однократно забирали кровь из локтевой вены утром натощак через 12 часов после приема пищи.

Все образцы венозной крови немедленно центрифугировались, сыворотки замораживались при температуре -20 градусов. Осуществлялось определение концентрации ММП-9 и ТИМП-1 с помощью наборов стандартных тест-систем для иммуноферментного анализа (Bender-MedSystems GmbH, Австрия) на планшетном спектрофотометре Plate Reader (Hospitex Diagnostics, Италия).

В сыворотке крови определены также липидный профиль: общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС ЛВП), холестерин липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП), триглицериды (ТГ) с помощью набора реагентов Human (Германия) и уровень цинка определен с помощью набора реагентов «Zinc-Vital» (Vital Development Corporation, Россия) на биохимическом автоматическом анализаторе Mindray BS-200 (Китай). Количественное определение уровня цинка в волосах и в АСБ осуществлялось методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной аргонной плазмой (ОЭС-ИСП) на анализаторе Optima 2100 DV (Perkin Elmer, США).

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке, вычисляя для каждой выборки среднюю арифметическую величину (M) и стандартную ошибку (m) и представлены в виде $M \pm m$. Различия между группами определяли с помощью t-критерия Стьюдента и считали статистически значимыми при уровне вероятности $p < 0,05$. Для выявления взаимосвязи между показателями использовался коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты исследования

Обе рассматриваемые группы были сопоставимы по частоте артериальной гипертензии, гиперлипидемии, ожирения, сахарного диабета 2 типа, стенокардии напряжения, инфаркта миокарда в анамнезе и возрасту. Однако во второй группе частота инсульта (57,1%) была в 2,6 раза выше, чем в 1 группе (22,2%). Мужчины в 1,3 раза больше во второй группе (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика пациентов обследованных групп

Показатели	1-я группа (n=45)	2-я группа (n=28)
Возраст, годы	67,9 \pm 1,5	62,8 \pm 1,2
Мужчины/женщины	30/15 (67%/33%)	25/3 (89%/11%)*
Артериальная гипертензия	42 (93,3%)	26 (92,9%)
Гиперлипидемия	22 (48,9%)	15 (53,6%)
Ожирение	19 (42,2%)	7 (25%)
Сахарный диабет	14 (31,1%)	14 (50%)
Стенокардия напряжения: ФК II ФК III	32 (71,1%) 4 (8,9%)	23 (82,1%) 3 (10,7%)
Инфаркт миокарда в анамнезе	6 (13,3%)	4 (14,3%)
Перенесенный инсульт	10 (22,2%)	16 (57,1%)*
ИМТ (кг/м ²)	27,7 \pm 0,59	27,2 \pm 0,79
ТКИМ ОСА, мм	0,99 \pm 0,04	1,2 \pm 0,05*
СССА, %	44,2 \pm 3,6	75,4 \pm 2,9*

Примечание. * - $p < 0,05$. ФК-функциональный класс, ИМТ-индекс массы тела, ТКИМ ОСА-толщина комплекса интима-медиа общей сонной артерии, СССА-степень стеноза сонных артерий.

При сравнении групп по показателям липидного профиля не было существенного различия между группами (табл. 2). Это связано с тем, что больным второй группы в 2,5 раза чаще назначались статины (22 (78,6%)), чем первой группы (14 (31,1%)).

Таблица 2. Характеристика биохимических показателей липидного профиля в сыворотке больных в обследуемых группах

Показатели	контрольная группа (n=10)	1-я группа (n=45)	2-я группа (n=28)
ОХС, ммоль/л	5±0,5	5,2±0,16	4,6±0,18
ТГ, ммоль/л	1,7±0,12	1,8±0,12	2,2±0,29
ХС ЛВП, ммоль/л	1,06±0,13	0,94±0,02	1,04±0,05
ХС ЛНП, ммоль/л	3,8±0,4	3,7±0,12	3,2±0,15

Между группами уровень цинка в биосубстратах статистически значимо не различался (табл.3).

Таблица 3. Уровень цинка в сыворотке, волосах и в АСБ

Биологический субстрат	контрольная группа (n=10)	1-я группа (n=45)	2-я группа (n=28)
Сыворотка, мкмоль/л	18,3±4,16	13,7±1,4	15,9±0,62
Волосы, мкг/г	208,65±84,23	220,5±17,07	212,5±17,01
АСБ, мкг/г	-	-	82,8±16,8

Сывороточные уровни ММП-9 были в 2,7 раза выше во второй группе - по сравнению с первой группой (539,03±57,1 нг/мл и 200,9±8,5 нг/мл, соответственно, $p < 0,001$). В контрольной группе концентрация ММП-9 составила 197,42±10,4 нг/мл, что существенно различается при сравнении с второй группой ($p < 0,001$), так во второй группе ММП-9 была в 2,7 раза выше, чем в контрольной группе. Но между первой и контрольной группой статистически значимого различия не обнаружено ($p > 0,05$).

Уровень ТИМП-1 были в 2 раза выше во второй группе, чем в первой группе (2410,2±123,8 нг/мл и 1180,98±47,98 нг/мл, соответственно, $p < 0,001$). Также при сравнении второй группы с контрольной группой (1192,5±61,5 нг/мл) выявлено значимое различие ($p < 0,001$). Уровень ТИМП-1 в этой группе был в 2 раза выше, нежели в контрольной группе. Однако между первой и контрольной группой не обнаружено статистически значимой различий ($p > 0,05$).

Индекс ММП-9/ТИМП-1 был в 1,6 раза выше во второй группе (0,24±0,03) чем, в контрольной группе (0,15±0,02) ($p < 0,02$). А при сравнении показателей первой группы (0,18±0,009) с показателями контрольной группы, также между первой и второй группами не выявлено статистически значимых различий ($p > 0,05$) (табл. 4).

Таблица 4. Уровни ММП-9, ТИМП-1 и индекса ММП-9/ТИМП-1 ($M \pm m$)

Показатели	контрольная группа (n=10)	1-я группа (n=45)	2-я группа (n=28)	p (к-1)	p (к-2)	p (1-2)
ММП-9, нг/мл	197,42 ±10,4	200,9 ±8,5	539,03 ±57,1	$p > 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
ТИМП-1, нг/мл	1192,5 ±61,5	1180,98 ±47,98	2410,2 ±123,8	$p > 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
ММП-9 /ТИМП-1	0,15 ±0,02	0,18 ±0,009	0,24 ±0,03	$p > 0,05$	$p < 0,02$	$p > 0,05$

Примечание. p (к-1)-значимость различие 1-группы по сравнению с контролем, p (к-2)-значимость различие 2-группы по сравнению с контролем, p (1-2)-значимость различие 1-группы по сравнению с 2-й группой.

При проведении корреляционного анализа данных обнаружена умеренная положительная корреляционная связь СССА с уровнями ММП-9 и ТИМП-1 ($r=0,47$ и $r=0,53$, соответственно, $p < 0,001$). Выявлена также заметная положительная взаимосвязь между двумя показателями ММП-9 и ТИМП-1 ($r=0,58$, $p < 0,001$). Согласно полученным результатам не выявлено существенной связи ММП-9 и ТИМП-1 с возрастом ($r=-0,16$ и $r=-0,11$, соответственно, $p > 0,05$).

Обнаружена слабая обратная связь уровня цинка в сыворотке с концентрацией его в волосах ($r=-0,21$; $p=0,07$) и положительная корреляция с уровнем цинка в АСБ ($r=0,21$; $p=0,07$). Выявлена слабая положительная корреляционная связь цинка в волосах с его уровнем в АСБ ($r=0,23$; $p < 0,05$), а также отрицательная корреляция между концентрацией цинка в сыворотке и ТКИМ ОСА ($r=-0,24$; $p < 0,05$).

При изучении ассоциации уровня ММП-9 и ТИМП-1 в сыворотке с концентрацией цинка в биосубстратах нами обнаружена слабая корреляция ММП-9 с уровнем цинка в АСБ ($r=-0,25$; $p<0,05$). Связь с остальными показателями была статистически не значимой.

Обсуждение

Результаты проведенного исследования показали повышенную концентрацию ММП-9 и ТИМП-1 в сыворотке крови у больных с нестабильными АСБ. Это подтверждает их роль в дестабилизации АСБ сонных артерий и использование в качестве маркера прогнозирования динамики каротидного атеросклероза. Аналогичные данные были получены и другими авторами [4, 9, 13, 17, 19, 21]. Кроме того, обнаружена значимая положительная корреляция уровней ММП-9 и ТИМП-1 со степенью стеноза сонных артерий, что согласуется с мнениями ряда исследователей [4, 7, 10, 15, 16].

В литературе указывается, что ТИМП строго регулирует ММП, в частности ТИМП-1 является ингибитором ММП-9 [15, с. 414]. Мы отметили заметную положительную корреляцию между ММП-9 и ТИМП-1. Повышение уровня ТИМП-1 параллельно с ММП-9 можно объяснить как компенсаторную реакцию, направленную на сдерживание активности ММП-9 и прогрессирования атеросклероза [2, с. 5]. Вместе с тем, некоторые авторы не обнаружили связь между ММП-9 и ТИМП-1 [10, с. 1040]. Индекс ММП-9/ТИМП-1 используется для оценки баланса между ММП и их ингибиторами. По данным ряда авторов [8, с. 388] у здоровых лиц этот показатель составил $0,11\pm 0,03$. В нашей работе это соотношение было выше у всех больных (в контрольной группе $0,15\pm 0,02$, в 1-группе $0,18\pm 0,009$, во 2-группе $0,24\pm 0,03$). У пациента, который на поверхности АСБ был обнаружен эмбологенный свежий тромб, этот показатель увеличивался даже на 0,47 (в 3 раза). Данные результаты указывают на превалирование активности ММП-9 над уровнем ТИМП-1.

Нами выявлена значимая обратная корреляция между ТКИМ ОСА и цинка в сыворотке, что соответствует результатам других авторов [5, с. 357]. В предшествующих публикациях указано на положительные и отрицательные данные по защитному эффекту цинка против атеросклероза [6, с. 179; 12, с. 288; 20, с. 324].

Stadler и соавт. [18, с. 1027] объясняли повышение уровня цинка как защитный эффект при атеросклерозе. Так, цинк может участвовать в механизме повышения стабильности АСБ, путем связывания с компонентами матрикса. При проведении корреляционного анализа они установили значительную положительную корреляцию между цинка и кальция в образцах каротидной эндартерэктомии ($r=0,89$; $p=0,0001$). Известно, что АСБ с кальцинированной фиброзной крышкой менее склонны к разрыву, чем АСБ с тонкой крышкой и высоким содержанием липидов. У людей с высоким уровнем цинка снижена степень сердечно-сосудистых осложнений может объясняться накоплением кальция и фиброза и, следовательно, снижением склонности к разрыву АСБ.

Таким образом, результаты проведенного исследования могут помочь в отборе больных с высоким риском развития сердечно-сосудистых событий. Использование соответствующих аналитических подходов дает возможность предсказать нестабильность атеросклеротической бляшки.

Выводы

1. У больных с нестабильной АСБ сонных артерий нарушается баланс ММП-9/ТИМП-1, повышается концентрация ММП-9, ТИМП-1 и их соотношения в сыворотке, что свидетельствуют о нестабильности АСБ.
2. Увеличению концентрации ММП-9 в сыворотке сопутствует снижение концентрации цинка в АСБ.
3. С прогрессированием атеросклероза, увеличением ТКИМ ОСА уровень цинка в сыворотке снижается, что ассоциируется со снижением уровня цинка в атеросклеротических бляшках
4. Снижение концентрации цинка в волосах сопровождается снижением уровня цинка в биоптатах атеросклеротических бляшек.

Литература

1. Гайгалайте В., Ожерайтене В., Калибатене Д. и др. Взаимосвязь между структурными изменениями атеросклеротических бляшек каротидных артерий и инфарктом миокарда // Кардиология. № 9. С. 21–25.
2. Головкин А. С., Матвеева В. Г. и др. Послеоперационная динамика уровня матриксных металлопротеиназ у пациентов с осложнениями коронарного шунтирования // Кардиология. 2012. № 9. С. 4–7.
3. Скальная М. Обоснование коррекции элементного дисбаланса у женщин перименопаузального возраста, страдающих обменными заболеваниями // Эстетическая медицина. 2010. № 2. С. 164–169.
4. Alvarez B., Ruiz C., Chacón P. et al. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis // J Vasc Surg. 2004. Vol. 40. P. 469–475.
5. Ari E., Kaya Y., Demir H. et al. The Correlation of Serum Trace Elements and Heavy Metals with Carotid Artery Atherosclerosis in Maintenance Hemodialysis Patients // Biol. Trace Elem. Res. 2011. Vol. 144. P. 351–359.

6. *Beattie J. H., Kwun I. S.* Is zinc deficiency a risk factor for atherosclerosis? // *Br J Nutr.* 2004. Vol. 91. P. 177–181.
7. *Beaudeux J. L., Giral P., Bruckert E. et al.* Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia // *Atherosclerosis.* 2003. Vol. 169. P. 139–146.
8. *Cheng M., Hashmi S., Mao X. et al.* Relationships of adiponectin and matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio with coronary plaque morphology in patients with acute coronary syndrome // *Can J Cardiol.* 2008. Vol. 24. P. 385–390.
9. *Eldrup N, Grønholdt ML, Sillesen H et al.* Elevated matrix metalloproteinase-9 associated with stroke or cardiovascular death in patients with carotid stenosis // *Circulation.* 2006. Vol. 114. P. 1847–1854.
10. *Gaubatz J. W., Ballantyne C. M., Wasserman B. A. et al.* Association of Circulating Matrix Metalloproteinases with Carotid Artery Characteristics: The ARIC Carotid MRI Study // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010. Vol. 30. P. 1034–1042.
11. *Heo SH, Cho CH, Kim HO et al.* Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9 // *J Clin Neurol.* 2011. Vol. 7. P. 69–76.
12. *Hughes S., Samman S.* The effect of zinc supplementation in humans on plasma lipids, antioxidant status and thrombogenesis // *J Am Coll Nutr.* 2006. Vol. 25. P. 285–291.
13. *Lofthus IM, Naylor AR, Bell PR et al.* Plasma MMP-9 – a marker of carotid plaque instability // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001. Vol. 21. P. 17–21.
14. *Newby A. C.* Metalloproteinases and Vulnerable Atherosclerotic Plaques // *Trends Cardiovasc Med.* 2007. Vol. 17. P. 253–258.
15. *Romero J. R., Vasan R. S., et al.* Association of carotid artery atherosclerosis with circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling: the Framingham Offspring Study // *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2008. Vol. 17. P. 412–417.
16. *Sapienza P., di Marzo L., Borrelli V. et al.* Metalloproteinases and their inhibitors are markers of plaque instability // *Surgery.* 2005. Vol. 137. P. 355–363.
17. *Silvello D, Narvaes LB, Albuquerque LC et al.* Serum levels and polymorphisms of matrix metalloproteinases (MMPs) in carotid artery atherosclerosis: higher MMP-9 levels are associated with plaque vulnerability // *Biomarkers.* 2014. Vol. 19. P. 49–55.
18. *Stadler N., Stanley N., Heeneman S. et al.* Accumulation of Zinc in Human Atherosclerotic Lesions Correlates With Calcium Levels But Does Not Protect Against Protein Oxidation // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. Vol. 28. P. 1024–1030.
19. *Tan C., Liu Y., Li W. et al.* Associations of matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 concentrations with carotid atherosclerosis, based on measurements of plaque and intima-media thickness // *Atherosclerosis.* 2014. Vol. 232. P. 199–203.
20. *Vasto S., Mocchegiani E., Candore G. et al.* Inflammation, genes and zinc in ageing and age-related diseases // *Biogerontology.* 2006. Vol. 7. P. 315–327.
21. *Zhou Z, Li X, Yang B et al.* Relationship between lysophosphatidic acid and matrix metalloproteinase-9 plasma concentrations and carotid atheromatous plaque stability in patients with cerebral infarction // *J Int Med Res.* 2014. Vol. 29. P. 669–676.
22. *Zitka O., Kukacka J., Krizkova S. et al.* Matrix Metalloproteinases // *Current Medicinal Chemistry.* 2010. Vol. 17. P. 3751–3768.